

鄱阳湖流域蚌类环境 DNA 宏条形码引物的筛选验证*

陈金萍, 周春花**, 欧阳珊, 黄晓晨, 吴小平

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要: 环境 DNA 技术是一种非侵入、高灵敏、高效率且对环境无破坏性, 对生物体无损伤的调查工具. 为了筛选适合于蚌类环境 DNA 生物多样性研究的宏条形码引物, 本研究通过对鄱阳湖流域 24 种常见蚌的基因组 DNA 进行普通扩增和高通量测序筛选了 11 对引物 (设计了 9 对通用引物及从相关文献中引用了 2 对引物), 结果显示引物 *cyt b* 和 16S rRNA 具有良好的扩增效果和高辨别度. 进一步用环境样本 ($n=6$) 并结合传统采样技术对这 2 对引物进行验证, 结果表明: 使用引物 16S rRNA 共注释到蚌科物种 6 属 8 种, 蚌科物种序列占总序列数的 26.69%; 而使用引物 *cyt b* 共注释到蚌科物种 4 属 6 种, 蚌科物种序列占总序列数的 6.60%. 引物 16S rRNA 更适合用于蚌类环境 DNA 生物多样性研究的宏条形码引物. 在生物多样性监测中环境 DNA 技术可以作为传统方法的有效补充, 且同时使用多对引物, 可增加可信度和检测率.

关键词: 环境 DNA; 生物多样性; 蚌类; 分子标记; 鄱阳湖流域

Universal primers screening and verification for environmental DNA metabarcoding of freshwater mussels in the Lake Poyang Basin*

Chen Jinping, Zhou Chunhua**, Ouyang Shan, Huang Xiaochen & Wu Xiaoping

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, P.R.China)

Abstract: Environmental DNA (eDNA) technology is a non-invasive, highly sensitive, efficient and non-destructive to the environment, no damage to the organism investigation tool. To select suitable metabarcoding primers for freshwater mussel's environmental DNA biodiversity research, 11 pairs of primers (with 9 pairs of universal primers designed and 2 pairs cited from relevant literature) were screened by general amplification and high-throughput sequencing of genomic DNA of 24 common mussels in the Lake Poyang Basin. The results showed that the primer *cyt b* and 16S rRNA had good amplification effect and high discrimination. The two pairs of primers were further verified with environmental samples ($n=6$) and traditional sampling. It was found that 8 mussels species belonging to 6 genera were annotated by 16S rRNA which accounted for 26.69% of the total sequences, and 5 mussels species belonging to 4 genera were annotated by *cyt b* which accounted for 6.60% of the total sequences. The primer 16S rRNA was more suitable used for metabarcoding primer for the research of environmental DNA biodiversity in freshwater mussels. Environmental DNA technology can be used as an effective supplement to traditional methods in biodiversity monitoring. The reliability and detection rate can be increased by using multiple pairs of primers at the same time.

Keywords: Environmental DNA; biodiversity; freshwater mussel; molecular markers; Lake Poyang Basin

淡水生态系统是世界上最脆弱的生态系统^[1], 蚌类是世界上最易受威胁的动物类群之一^[2]. 蚌类是一种重要的底栖动物, 在淡水生态系统中占有非常重要的地位, 它们不但是食物链中不可缺少的环节, 而且对水质净化起着重要的作用, 许多种类具有较高的经济价值^[3-5]. 蚌类资源的调查具有挑战性, 因为它们存在于高浊度或低能见度的生境, 并且蚌类种群密度低、斑片状分布、与相近物种杂交以及存在潜在的隐藏种. 传统调查方法即直接捕捉会破坏它们的生活环境, 使种群规模变小, 造成二次伤害, 耗费大量人力物力, 且与现行的禁渔政策相悖. 此外, 由于蚌类鉴别特征少, 高变异性所以难以鉴定, 需要专门的分类学知识^[6]. 因

* 2020-09-07 收稿; 2020-11-26 收修改稿.

国家重点研发计划“蓝色粮仓”重点专项(2018YFD0900801)资助.

** 通信作者; E-mail: zhouchunhua@jx@hotmail.com.

此,亟需一种不违背目前政策的、高效率、低成本和高灵敏度的监测方法来评估蚌类生物多样性。

环境 DNA 技术是最近开发的一种非侵入、高灵敏、高效率且无损伤的调查工具。环境 DNA 是从环境样本(例如土壤、水样、空气)中提取的总 DNA,不需要对任何目标生物体进行分离^[7]。利用环境 DNA 技术可以从环境样品中直接提取 DNA 片段后利用测序技术对生物进行定性或定量分析。最早将环境 DNA 技术用于淡水生态系统的是监测一种入侵物种——美国牛蛙^[8]。此后,很多水生物种开始使用环境 DNA 技术研究,但在蚌类中的研究起步稍晚。Carlsson 等利用环境 DNA 技术检测到了欧洲淡水濒危种珠母珍珠蚌的存在,并且认为环境 DNA 在物种检测中可作为一种非常重要的工具^[9]。随后环境 DNA 作为一种检测工具在濒危蚌中的有效性得到 Currier 等学者的确认^[10]。Peñarrubia 等将环境 DNA 技术用来检测两种入侵蚌的位置,并认为其在入侵种早期的预防扩散中发挥着至关重要的作用^[11]。Shogren 等对入侵蚌的环境 DNA 在河流中转运方式及浓度变化作了进一步的研究^[12]。Prié 等利用环境 DNA 宏条形码评估了西古北界淡水双壳类 2 个科的生物多样性^[6]。环境 DNA 技术用于蚌类的研究多限于监测入侵种和濒危种,而对于生物多样性的研究鲜见报导。研究环境 DNA 方法应用于检测生物多样性的研究催生了宏条形码的产生^[13]。宏条形码技术不仅提供了准确、快速的物种多样性监测手段,还提供了认识和解决环境问题的新方式。在使用环境 DNA 宏条形码技术监测生物多样性时,首先需要进行的的就是针对不同的目标种选取 DNA 识别片段来设计引物。环境 DNA 宏条形码引物在监测、定量过程中存在较大偏好性,选择适合的引物可识别生态群落中不同的物种。但环境中细胞外源的 DNA 会不断降解,在保证物种分辨率的前提下,选择的分子标记越短越好。所以使用宏条形码技术分析环境 DNA 的研究中,为了避免在不同分类种群中放大偏差,选择设计较短的、高度保守序列片段的引物是极其重要的。如果实验设计的引物保守度低和特异性不足的话,容易引起碱基错配甚至引起假阳性和假阴性的实验结果。

蚌的分布呈明显的地域性特征,北美蚌类特有种多集中于美国,而亚洲蚌类最丰富的国家则是中国,且集中分布在长江中下游地区^[14]。鄱阳湖是长江中下游主要支流之一。为了筛选出适合蚌类环境 DNA 生物多样性研究的宏条形码引物,本研究设计了多对通用引物,通过普通 PCR 扩增和高通量测序筛选这些引物,并用鄱阳湖流域水样验证所筛选引物的效果,以期为蚌类环境 DNA 生物多样性监测提供参考。

1 材料和方法

1.1 选择序列及设计引物

NCBI 上下载中国蚌科 27 种蚌的母系线粒体基因组序列。选择线粒体序列是因为每个细胞的线粒体 DNA 拷贝比核 DNA 拷贝多得多,当环境 DNA 浓度很低或降解时,线粒体 DNA 更为靶向^[15]。本研究所在的课题组得出线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因可作为蚌科 DNA 条形码,用于蚌科物种的快速鉴定^[16],所以我们选取线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因全序列。在前期实验中发现蚌科通用引物 16S rRNA 扩增效果较好,对蚌科物种有较好的辨识度,且产物大小也符合我们设计的原则^[17]。在对水样进行高通量测序时发现,用于鱼类环境 DNA 多样性研究的引物 *cyt b* 能鉴定出蚌科动物^[18]。因此,我们把这 2 对引物也列入了筛选对象,详见表 1。设计引物的具体步骤如下,首先,在下载 27 种蚌的线粒体全序列中找到 *cox1*、*nad1* 和 *cyt b* 基因的保守区域,在 mega 中比对(图 1);然后,使用软件 Primer Premier 5 设计通用引物,设置参数如下:引物长度(21±5) bp,扩增产物长度在 100~400 bp 之间,优先选择不含发夹结构、无引物二聚体和错配较少的引物序列;最后,在 mega 中输入设计的引物,查找其保守区,变异位点位置。引物在靶序列的位置如图 2。

1.2 普通 PCR 扩增筛选引物

提取单个蚌科物种(24 种,详见表 2)的组织 DNA:取酒精固定或-80℃ 保存的蚌类闭壳肌,使用蛋白酶 K 消化,试剂盒(TIANamp® Marine Animal DNA Kit)提取,最后溶解于 70 μL TE 缓冲液中,-20℃ 保存备用。

用本研究设计的通用引物及引用的引物分别对这 24 个物种进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s,退火(47~56℃) 40 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环; 71℃ 延伸 10 min;最后 4℃ 保存。PCR 反应体系(25 μL): 10×buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1.25 μL, Taq 酶 0.2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 15.8 μL。PCR 反应所用的酶为 TaKaRa Premix。筛选出可以同时扩增出这 24 个蚌类物种,且凝胶电泳条带清晰单一的引物对,并对 PCR 产物加以测序验证,确保为目的物种的序列。

表 1 本研究设计及引用的引物信息

Tab.1 Information of the study designed and quoted primer

| 引物名称 | 引物序列(5'~3') | 扩增片段长度/bp | 变性温度/℃ |
|------------------------------|---|-----------|--------|
| <i>cox1</i> ¹⁰⁰ | COImF:AGAGTTGGGTCAGCCAGGGA | 100 | 52 |
| | COImR:CATAGGCATCACCAGAAAGA | | |
| <i>cox1</i> ²⁷³ | COIejF:CCTTGCYGGTGCTTCG | 273 | 56 |
| | COIejR:TCAGGTTGACCAAARAAYCA | | |
| <i>cox1</i> ²³³ | COIej22F:GTTGCTCATCTCGGGC | 233 | 53 |
| | COIej22R:CGGTCAGTAAGTAACATCGTAA | | |
| <i>cox1</i> ¹³⁴ | COIej134F:TTTTGGGTATTTGGGGA | 134 | 50 |
| | COIej134R:AATCATCGTAGCAGCAGT | | |
| <i>nad1</i> ²³⁴ | NadejF:CCCAAAGAAAGACGATT | 234 | 47 |
| | NadejR:TAAGGACYATRTGAACTGC | | |
| <i>nad1</i> ²⁸⁰ | Nadej280F:CCCAAAGAAAGACGATT | 280 | 48 |
| | Nadej280R:CGACTGACCAACACACTAA | | |
| <i>nad1</i> ²⁶⁸ | Nadej268F:AGTAGTTDGAAGATRCCGG | 268 | 52 |
| | Nadej268R:TGGCAGAAAAGTGCATCAGATTAAGC | | |
| <i>cyt b</i> ²³⁴ | CYBejF:CAATCGCAATGATACTHHT | 234 | 52 |
| | CYBejR:GTAKTANATTCCACGHCT | | |
| <i>cyt b</i> ¹⁸¹ | CYBej181F:CCCTCTTRTYGTTTGRATC | 181 | 52 |
| | CYBej181R:TTAGTAATACCAGTCGCCCCACA | | |
| <i>cyt b</i> ^[17] | L14912-CYB:TTCTAGCCATACAYTAYAC | 285 | 52 |
| | H15149-CYB:GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTTGKCCYCA | | |
| 16S rRNA ^[18] | 16S rRNA-3L:TGAGCGTGCTAAGGTAGC | 340 | 52 |
| | 16S rRNA-4H:AGCCAACATCGAGGTCCG | | |

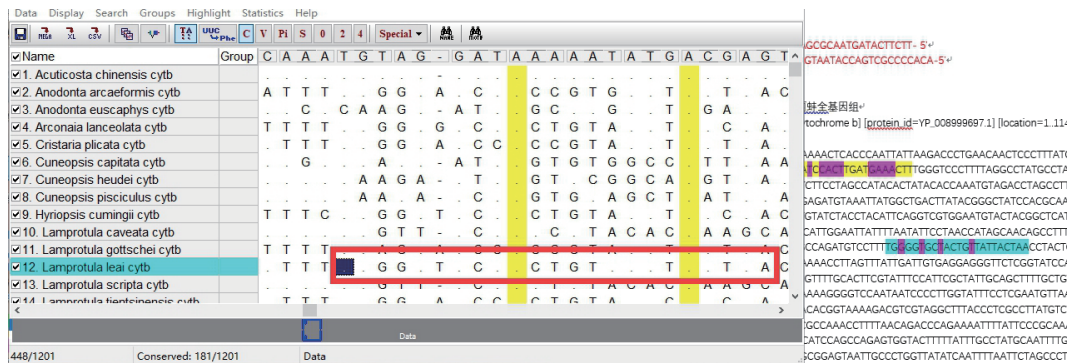


图 1 *cyt b*²³⁴下游引物的位置

Fig.1 The location of the *cyt b*²³⁴ downstream primers

1.3 构建文库及高通量测序筛选引物

随机将这 24 个蛙科物种的 DNA 混合,即每个蛙的 DNA 各 1 μL 装至 1 个管中,用上一步筛选出的引物进行高通量测序进一步筛选.对原液进行 PCR 扩增,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,PCR 反应体系为 25 μL,5×reaction buffer 5 μL, 5×GC buffer 5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 3 μL, ddH₂O 7.75 μL, Q5 DNA 酶 0.25 μL. PCR 程序:98℃ 预变性 5 min;98℃ 变性 30 s、55℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 45 s(35 个循环);72℃ 再延伸 5 min;12℃ 保存. 对目标片段进行切胶回收,然后采用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序,之后采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测

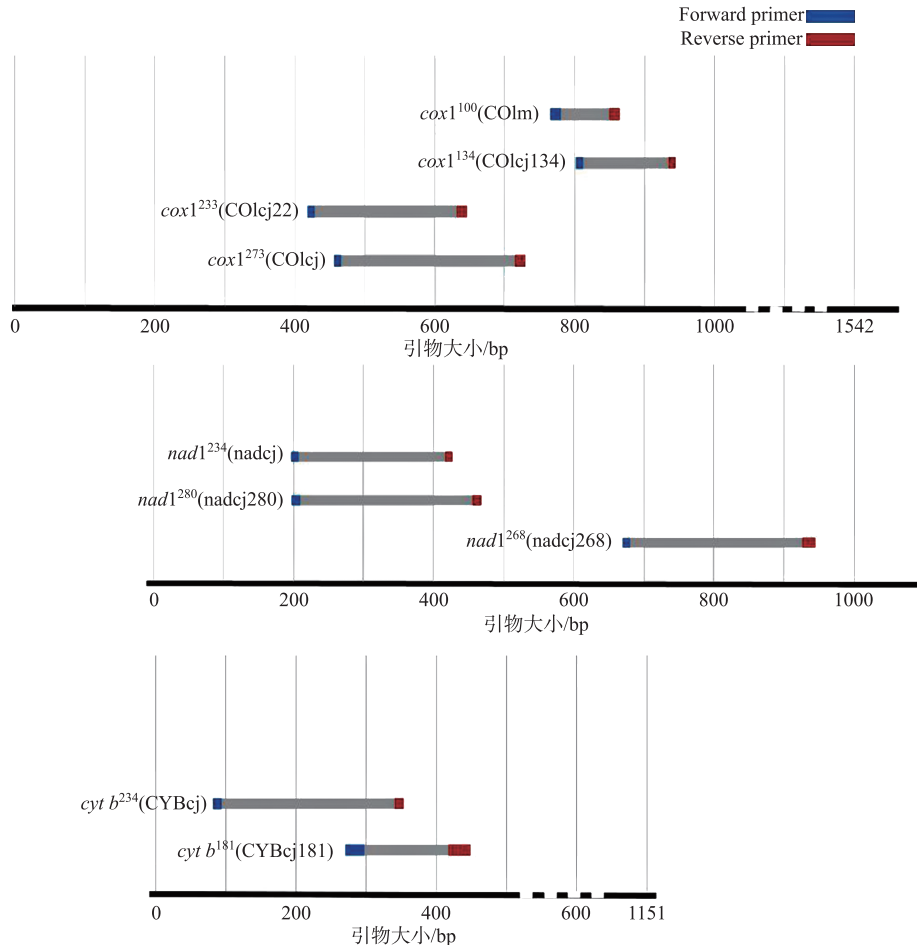


图 2 引物在靶序列中的位置

Fig.2 The position of the primers in the target sequence

序文库. 最后对原始 reads 数进行整理过滤及质量评估,剔除嵌合体序列,如:1) 5' 端引物错配碱基数 > 1 的序列;2) 含有连续相同碱基数 > 8 的序列等. 产生的可操作性分类单元(operational taxonomic units, OTUs)通过 BLAST 在 NCBI 数据库中查找蚌科物种同源序列,以 97% 的序列相似度作为 OTU 划分阈值,该阈值大致相当于分类学中物种(Species)水平的序列差异. 且 e_value (e 值) $< 1 \times 10^{-5}$ 作为该序列的物种注释信息. 对于 NCBI 数据库中没序列的棘裂脊蚌(*Schistodesmus spinosus*)、微红楔蚌(*Cuneopsis rufescens*)、矛形楔蚌(*Cuneopsis celtiformis*),我们补测了其线粒体基因组全序列.

1.4 水样采集、传统数据采集、DNA 提取及测序

于 2019 年 4 月在鄱阳湖子湖青岚湖进行水样采集,设置了 6 个取样点,每个样点的坐标如下:1[#] (28.536°N, 116.166°E)、2[#] (28.471°N, 116.164°E)、3[#] (28.928°N, 116.157°E)、4[#] (28.513°N, 116.142°E)、5[#] (29.472°N, 116.110°E)、6[#] (29.164°N, 115.934°E). 6 个采样点水体总体较浑浊,水流较湍急,水面浮有水生植物,有渔船,人工养殖带,时有鸟栖居,岸边有堤坝或沙带,水草灌木茂盛,水体连通性较好. 每个点用采水器采集 1 L 中下层水样,做 3 次重复,并在相应采样点同时进行传统方法采集蚌(蚌耙采蚌),水样和蚌的采集都在渔船上进行,采集活体蚌之后,当天返回实验室进行鉴定. 选取 6 个点的水样用高通量筛选出的引物进行验证. 水样于采集后 24 h 内用 0.45 μm 的混合纤维素滤膜过滤. 使用 DNeasy Blood & Tissue Kit

表 2 用于 DNA 提取、PCR 扩增所用的 24 个蚌科物种及高通量测序比对结果

Tab.2 24 mussels used for DNA extraction and PCR amplification and results of high-throughput sequencing

| 中文名(拉丁名) | 编号 | 引物名称 | | |
|---|----|--------------|----------------------------|----------|
| | | <i>cyt b</i> | <i>cox1</i> ²³³ | 16S rRNA |
| 短褶矛蚌(<i>Lanceolaria grayana</i>) | 1 | + | + | + |
| 剑状矛蚌(<i>Lanceolaria gladiola</i>) | 2 | + | + | + |
| 微红楔蚌(<i>Cuneopsis rufescens</i>) | 3 | + | + | + |
| 矛形楔蚌(<i>Cuneopsis celtiformis</i>) | 4 | + | + | + |
| 鱼尾楔蚌(<i>Cuneopsis pisciculus</i>) | 5 | + | + | + |
| 圆头楔蚌(<i>Cuneopsis heudei</i>) | 6 | + | + | + |
| 三角帆蚌(<i>Hyriopsis cumingii</i>) | 7 | + | + | + |
| 背瘤丽蚌(<i>Lamprotula lei</i>) | 8 | + | + | + |
| 洞穴丽蚌(<i>Lamprotula caveata</i>) | 9 | + | + | + |
| 刻裂尖丽蚌(<i>Aculamprotula scripta</i>) | 10 | + | + | + |
| 天津尖丽蚌(<i>Aculamprotula tientsinensis</i>) | 11 | + | + | + |
| 失衡尖丽蚌(<i>Aculamprotula tortuosa</i>) | 12 | + | + | + |
| 卵形尖嵴蚌(<i>Acuticosta ovata</i>) | 13 | + | - | - |
| 中国尖嵴蚌(<i>Acuticosta chinensis</i>) | 14 | + | + | + |
| 扭蚌(<i>Arconaia lanceolata</i>) | 15 | + | + | + |
| 背角无齿蚌(<i>Anodonta woodiana woodiana</i>) | 16 | + | + | + |
| 蚌形无齿蚌(<i>Anodonta arcaeformis</i>) | 17 | + | - | + |
| 褶皱冠蚌(<i>Cristaria plicata</i>) | 18 | + | + | + |
| 高顶鳞皮蚌(<i>Lepidodesma languilati</i>) | 19 | + | - | + |
| 圆顶珠蚌(<i>Nodularia douglasiae</i>) | 20 | + | + | + |
| 射线裂脊蚌(<i>Schistodesmus lampreyanus</i>) | 21 | + | - | + |
| 棘裂脊蚌(<i>Schistodesmus spinosus</i>) | 22 | - | - | + |
| 橄榄蛭蚌(<i>Solenia oleivora</i>) | 23 | + | + | + |
| 龙骨蛭蚌(<i>Solenia carinata</i>) | 24 | + | - | + |

“+”表示检测到该蚌;“-”表示没有检测到.

(Qiagen)提取环境 DNA. Qubit (Thermo Fisher Scientific)测试 DNA 浓度. 3 个重复样本混合后提取 DNA,并测浓度,然后由上海派森诺生物科技股份有限公司进行高通量测序. PCR 反应体系和步骤如下,PCR 反应体系为 25 μ L, 5 \times reaction buffer 5 μ L, 5 \times GC buffer 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 8.75 μ L, Q5 DNA 酶 0.25 μ L, PCR 程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;98 $^{\circ}$ C 变性 15 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s (30 个循环);72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min;10 $^{\circ}$ C 保存(注:因引物的退火温度不同,每个引物会进行部分微调). 质控步骤与上文一致. 测序结果在 NCBI 数据库中进行比对验证,以 97% 的序列相似度,且 e -value (e 值 $<1 \times 10^{-5}$) 最小的,作为该序列的物种注释信息(因为 e 值越小准确度越高,可信度也越高). 在物种注释中,对于 reads <3 的 OTU 不作统计.

2 结果

2.1 普通 PCR 扩增筛选引物结果

用表 1 所列的 11 对引物分别对提取的 24 个蚌科物种的 DNA 进行 PCR 扩增,有 3 对引物(*cyt b*、*cox1*²³³和 16S rRNA)能将这 24 个蚌科物种都扩增出来,扩增条带清晰明亮,且扩增产物大小符合预期大小,如图 3~图 5. 其余 8 对引物均不能完全地扩增出这 24 个蚌科物种,或者是扩增效果不理想.

2.2 高通量测序筛选引物

用普通 PCR 扩增筛选出的 *cyt b*、*cox1*²³³ 和 16S rRNA 三对引物对混合 24 个蚌科物种的 DNA 进行高通量

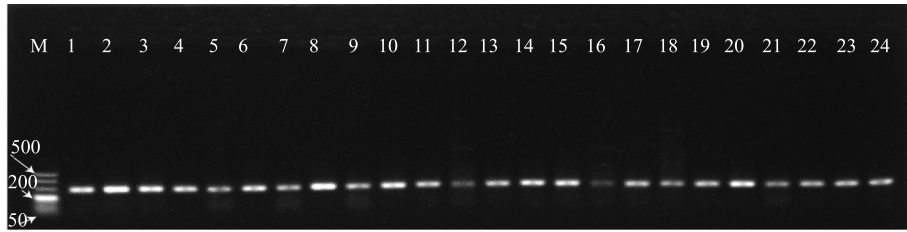
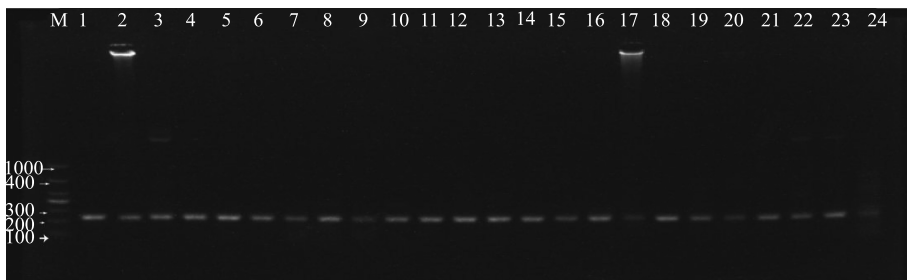
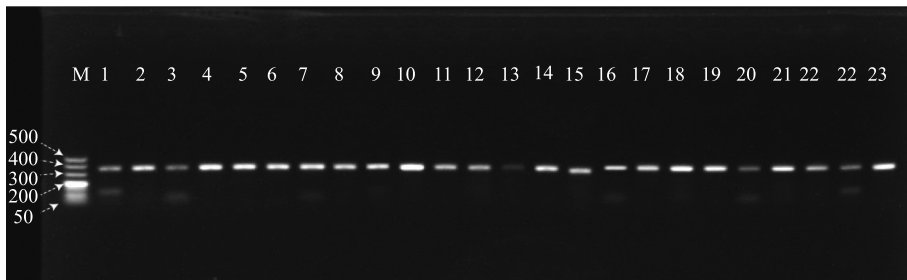
图3 使用引物 *cyt b* 扩增蚌科动物的结果(M: DNA Marker 500, 1~24 编号对应的蚌类见表 1)Fig.3 Results of mussels(Unionidae) amplified by primer *cyt b*图4 使用引物 *cox1*²³³ 扩增蚌科动物的结果(M: DNA Marker 1000, 1~24 编号对应的蚌类见表 1)Fig.4 Results of mussels(Unionidae) amplified by primer *cox1*²³³

图5 使用引物 16S rRNA 扩增蚌科动物的结果(M: DNA Marker 500, 1~24 编号对应的蚌类见表 1)

Fig.5 Results of mussels(Unionidae) amplified by primer 16S rRNA

测序,16S rRNA 扩增产物测序共获得 202148 条 reads,蚌 201683 条 reads;*cyt b* 扩增产物测序共获得 55096 条 reads,其中蚌类有 55038 条;*cox1*²³³ 扩增产物测序共获得 179354 条 reads,其中蚌类有 179277 条. 通过 BLAST 对 OTUs 进行物种注释,引物 *cyt b* 的扩增产物注释到 24 种蚌中的 23 种蚌,只有棘裂脊蚌没有注释到,该引物辨识度达 96%;引物 *cox1*²³³ 的扩增产物注释到 18 种蚌,而没有注释到卵形尖嵴蚌、蚶形无齿蚌、高顶鳞皮蚌、射线裂脊蚌、棘裂脊蚌和龙骨蛭蚌,引物辨识度只有 75%;引物 16S rRNA 的扩增产物能注释到除卵形尖嵴蚌之外的所有物种,该引物辨识度也达 96%. 高通量测序比对结果详见表 2.

2.3 水样环境 DNA 高通量测序

为验证引物效果,对 6 个样点的水环境 DNA 使用引物 *cyt b* 和 16S rRNA 扩增后进行高通量测序. 16S rRNA 扩增产物测序共获得 461185 条 reads,其中蚌类的序列有 123104 条,占 26.69%,共注释到蚌科 6 属 8 种(表 3). *cyt b* 扩增产物共获得 97263 条 reads,其中蚌类共 6416 条,约占 6.60%,共注释到蚌科 4 属 6 种(表 3). 2 对引物共检出蚌科 7 属 11 种,均注释到圆顶珠蚌、洞穴丽蚌、背瘤丽蚌. 传统方法在 6 个点采集到

的活体蚌 9 属 13 种(表 3). 环境 DNA 技术和传统方法共同鉴定出圆顶珠蚌、背角无齿蚌、洞穴丽蚌、扭蚌、短褶矛蚌.

表 3 环境 DNA 的鉴定结果及传统方法采集的蚌科物种信息

Tab.3 Identification results of environmental DNA and information of mussels collected by traditional methods

| 物种 | 引物 <i>cyt b</i> | | | | | | 引物 16S rRNA | | | | | | 传统方法 | | | | | |
|-------|-----------------|----|----|----|----|----|-------------|----|----|----|----|----|------|----|----|----|----|----|
| | 1# | 2# | 3# | 4# | 5# | 6# | 1# | 2# | 3# | 4# | 5# | 6# | 1# | 2# | 3# | 4# | 5# | 6# |
| 圆顶珠蚌 | + | | | | | | + | + | + | + | + | + | | + | | | | + |
| 洞穴丽蚌 | | | | | + | | + | + | | | | | + | + | + | + | | + |
| 背角无齿蚌 | | | | | | | + | + | + | + | + | | | + | | | | + |
| 扭蚌 | | | | | | | + | + | | + | + | | | | | | | + |
| 失衡尖丽蚌 | | | | | | | + | | | | | | | + | | | | |
| 短褶矛蚌 | | | | | + | | | | | | | | + | + | | + | | |
| 背瘤丽蚌 | | + | + | | + | + | | + | | | | | | | | | | |
| 射线裂脊蚌 | | | | | | | | | | | | | + | | + | | | + |
| 光滑无齿蚌 | | | | | | | | + | | | | | | | | | | |
| 中国尖嵴蚌 | | | | | | | | | | | | | | | | + | + | + |
| 卵形尖嵴蚌 | | | | | | | | | | | | | | | | + | + | + |
| 圆头楔蚌 | | | | | | | | | | | | | | | | + | + | + |
| 绢丝尖丽蚌 | | | | | | | | | | | | | | | | + | | |
| 刻裂尖丽蚌 | | | | | + | | | | | | | | | | | | | |
| 剑状矛蚌 | | | | | + | | | | | | | | | | | | | |
| 龙骨蛭蚌 | | | | | | | | | | | + | | | | | | | |
| 棘裂脊蚌 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| 鱼尾楔蚌 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |
| 蚌形无齿蚌 | | | | | | | | | | | | | | | | | | + |

* “+”代表该种类可被检测到.

2.4 序列相对丰度

两对引物注释到的蚌类物种的序列数及占有所有蚌的序列数的比例见表 4. 引物 *cyt b* 注释到的背瘤丽蚌和剑状矛蚌的序列数较多, 分别占蚌总序列数的 54.27% 和 34.13%; 引物 16S rRNA 注释到的 8 个物种中, 序列数占比最多的为圆顶珠蚌(84.76%), 其次是背角无齿蚌(10.86%), 最少的为龙骨蛭蚌(0.01%). 传统方法捕捉到的活体蚌类物种个数见表 4, 最多的蚌是洞穴丽蚌(41.18%), 其次是中国尖嵴蚌(16.67%).

3 讨论

3.1 引物的偏好性

理想的环境 DNA 宏条形码引物应该具有高度保守、高辨别度没有物种偏好性等优点^[19]. 本研究中引物 *cyt b*、16S rRNA 和 *cox1*²³³ 都具有高保守度, 即都能将待测物种稳定扩增出. 在环境 DNA 的引物筛选研究中, 有研究者用水样 DNA 来进行引物筛选^[20-21], 不同的引物对相同的水样注释到的物种存在差异, 缺乏一个已知的物种信息名录, 无法判断引物的辨别度情况. 而本研究用已知的多个物种 DNA 混合后进行高通量测序, 来进一步了解引物的辨别度, 引物 *cyt b* 和 16S rRNA 辨别度都达 96%, 均高于引物 *cox1*²³³ 引物的辨别度. 我们认为影响引物辨别度的因素主要有 2 个: 一是在单物种扩增时, 虽然都能很好地扩增出来, 但多个物种在引物结合位点没有差异; 二是在高通量测序时引物存在偏好性. 因此, 我们建议在筛选环境 DNA 宏条形码引物时, 先用一代测序验证引物的辨别度, 再用二代测序了解引物的偏好性.

环境 DNA 宏条形码引物在物种多样性和丰富度研究中存在较大偏好性, 即对单个物种的扩增效果很好, 但当混和多个物种的 DNA 后, 有些物种无法扩增出, 导致后续高通量测序注释不到该物种^[22-23]. 本研究结果表明, 高通量测序结果中引物 *cyt b* 没有检测到棘裂脊蚌, 推断 PCR 扩增中由于引物的偏好性导致棘裂

表 4 水样环境 DNA 检测物种注释序列数和传统方法捕捞活体数
Tab.4 The number of sequences for each species identified by environmental DNA and the number of living species captured by traditional methods

| 方法 | 物种 | 序列数 | 占比/% | 方法 | 物种 | 活体数 | 占比/% |
|--------------|-------|--------|-------|-------|-------|------|-------|
| <i>cyt b</i> | 背瘤丽蚌 | 3482 | 54.27 | 传统方法 | 洞穴丽蚌 | 42 | 41.18 |
| | 剑状矛蚌 | 2190 | 34.13 | | 中国尖嵴蚌 | 17 | 16.67 |
| | 洞穴丽蚌 | 402 | 6.27 | | 圆顶珠蚌 | 8 | 7.84 |
| | 刻裂尖丽蚌 | 252 | 3.91 | | 卵形尖嵴蚌 | 7 | 6.86 |
| | 短褶矛蚌 | 67 | 1.04 | | 圆头楔蚌 | 7 | 6.86 |
| | 圆顶珠蚌 | 23 | 0.36 | | 短褶矛蚌 | 7 | 6.86 |
| 16S rRNA | 圆顶珠蚌 | 101075 | 84.76 | 射线裂嵴蚌 | 5 | 4.90 | |
| | 背角无齿蚌 | 12945 | 10.86 | 背角无齿蚌 | 3 | 2.94 | |
| | 扭蚌 | 3116 | 2.61 | 蚌形无齿蚌 | 2 | 1.96 | |
| | 洞穴丽蚌 | 1379 | 1.16 | 绢丝尖丽蚌 | 1 | 0.98 | |
| | 背瘤丽蚌 | 686 | 0.57 | 扭蚌 | 1 | 0.98 | |
| | 失衡尖丽蚌 | 25 | 0.02 | 鱼尾楔蚌 | 1 | 0.98 | |
| | 光滑无齿蚌 | 16 | 0.01 | 棘裂脊蚌 | 1 | 0.98 | |
| | 龙骨蛭蚌 | 6 | 0.01 | | | | |

蚌蚌没有扩增出来. 引物 *cox1*^[23] 有多个物种没有检测出来, 表明该引物有多种蚌没有扩增出, 存在较大的引物偏好性. 同理 16S rRNA 没有检测到卵形尖嵴蚌, 暗示 PCR 扩增中由于引物的偏好性导致卵形尖嵴蚌没有扩增出来. 引物存在偏好性的原因是通用引物在设计时为了能同时扩增出尽可能多的物种, 简并度较高, 也导致引物对物种的扩增能力存在较大差异. 因此使用通用引物对混合物种 DNA 进行 PCR 时, 不可避免地会存在物种扩增效率差异. 因此, 我们建议在进行蚌科环境 DNA 宏条形码研究时, 可以用多对通用引物进行高通量测序鉴定物种, 可以有效地避免由于引物偏好性引起的物种遗漏. 且使用多重标记即多个引物对, 在水生环境 DNA 方法中已经得到大量应用, 且可以增加可信度、准确度以及检测率^[24-26].

3.2 环境 DNA 方法与传统方法在蚌科物种多样性研究中的比较

本研究使用环境 DNA 方法共检测到蚌科 7 属 11 种, 传统方法共采集到蚌科 9 属 13 种, 有 5 种蚌为两种方法共同鉴定出, 2 种方法在 6 个样点中鉴定的物种存在一些差异, 一是因为环境 DNA 会随着水流移动, 它并不能实时地反映该采样点的物种信息; 二是因为环境 DNA 容易降解, 在不同条件 (温度、紫外线强度、微生物群落等) 下降解速率不同^[27]; 三是采样策略不同, 传统方法用蚌耙采集, 采集的是底层的蚌活体, 环境 DNA 方法采集的是中下层水样; 四是受 PCR 引物偏好性的影响, 利用通用引物进行混合物种 DNA 扩增, 通常会导致较大的物种扩增效率差异^[24]. 环境 DNA 方法在 3 个 (样点 1[#]、2[#]、5[#]) 点中检测到了比传统方法更多的蚌科物种数, 且环境 DNA 方法检测到了濒危物种龙骨蛭蚌, 而这个物种在传统方法中没有采集到. 传统方法采集到的优势种为洞穴丽蚌、中国尖嵴蚌、圆顶珠蚌, 这和以前的研究结果相一致^[28], 而环境 DNA 方法中, 引物 *cyt b* 检测到序列占优势的为背瘤丽蚌、剑状矛蚌、洞穴丽蚌, 引物 16S rRNA 检测到序列占优势的为圆顶珠蚌、背角无齿蚌、扭蚌. 这表明序列的相对丰度和物种的相对丰度并没有得到很好的体现. 虽然理论上来说, 序列的相对丰度可能会体现物种的相对丰度^[29], 但两者的相关性没有得到很好的证明^[30-31]. 很多研究表明 PCR 的偏好性是造成环境 DNA 序列的相对丰度无法体现物种的相对丰度的最主要因素^[32]. 造成 PCR 偏好性最重要的原因是引物和模板之间存在不同碱基数量的错配, 错配数量少的更易扩增, 导致其在 PCR 过程中过量扩增^[33]. 其次, 碱基组成也影响引物结合效率, 比如 GC 含量过高的模板不易扩增^[34]. 现有环境 DNA 分析大多依赖 PCR 扩增, 因此控制和减轻 PCR 的偏好性是环境 DNA 对水生生物多样性监测的主要挑战之一.

在传统方法采集到的 13 种蚌中, 绢丝尖丽蚌在 NCBI 中无线粒体基因片段 16S rRNA 和 *cyt b*, 这直接影响环境 DNA 方法对绢丝尖丽蚌的注释, 导致环境 DNA 方法检测不到该物种. 目前 NCBI 上记录了蚌科 60

个种的线粒体全基因组序列,其中中国蚌有 27 种,还有很多中国蚌科物种的线粒体基因组信息有待进一步完善. 使用引物 16S rRNA 共注释到蚌科 6 属 8 种,蚌科物种序列占总序列数的 26.69%,而使用引物 *cyt b* 共注释到蚌科 4 属 6 种,蚌科物种序列占总序列数的 6.60%,且引物 16S rRNA 在每个样点鉴定的物种数均多于引物 *cyt b*. 本次水样环境 DNA 高通量测序结果表明在蚌科环境 DNA 生物多样性鉴定方面引物 16S rRNA 优于 *cyt b*,最新报道的欧洲淡水双壳类的生物多样性评估中用的也是 16S rRNA 基因的引物^[6].

4 结论

本研究筛选了 11 对引物,在对蚌类进行普通 PCR 筛选引物时,8 对引物不能稳定扩增出所有蚌,3 对 (*cox1*²³³、*cyt b* 和 16S rRNA) 能稳定扩增出所有蚌. 对这 3 对引物进行混合蚌 DNA 高通量测序进一步筛选, *cox1*²³³ 辨别度不高,而 *cyt b* 和 16S rRNA 有较高的辨别度. 同时用这 2 对引物对水样进行高通量测序显示,引物 16S rRNA 注释到的蚌科物种序列占总序列数的百分比高,且能注释到更多的物种. 引物 16S rRNA 更适合用于蚌类环境 DNA 生物多样性研究的宏条形码引物. 环境 DNA 调查用约占传统捕捞调查 1/100~1/10 的调查次数, 1/100000~1/100 的调查时间,检测到了 80% 的蚌类种数,表明环境 DNA 方法调查效率更高. 并且用分子生物学知识来鉴定,准确度更高. 所以在蚌科生物多样性研究方面,环境 DNA 方法可以作为传统方法的有效补充,但适用于蚌科环境 DNA 技术的数据库还有待于完善,更多适合于蚌科环境 DNA 宏条形码生物多样性检测的分子标记有待于开发,多个分子标记联合使用可增加环境 DNA 技术的准确度和检测率.

致谢: 感谢刘雄军博士在传统方法采蚌方面给予的帮助,感谢王维开硕士在水样采集方面的帮助,感谢裘雪梅老师在数据处理方面的帮助.

5 参考文献

- [1] Dudgeon D. Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. *Current Biology*, 2019, **29**(19): R960-R967. DOI: 10.1016/j.cub.2019.08.002.
- [2] Lopes-Lima M, Sousa R, Geist J *et al.* Conservation status of freshwater mussels in Europe: State of the art and future challenges. *Biological Reviews*, 2017, **92**(1): 572-607. DOI: 10.1111/brv.12244.
- [3] Bogan A. Freshwater molluscan conservation in North America: Problems and practices. *Journal of Conchology*, 1998, (SPEC. ISS): 223-230.
- [4] Dillon RT ed. The ecology of freshwater molluscs. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 22-26.
- [5] Amoros C, Bornette G. Connectivity and biocomplexity in waterbodies of riverine floodplains. *Freshwater Biology*, 2002, **47**(4): 761-776. DOI: 10.1046/j.1365-2427.2002.00905.x.
- [6] Prié V, Valentini A, Lopes-Lima M *et al.* Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*, 2020. DOI: 10.1007/s10750-020-04260-8.
- [7] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M *et al.* Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 1789-1793. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2012.05542.x.
- [8] Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, **4**(4): 423-425. DOI: 10.1098/rsbl.2008.0118.
- [9] Carlsson JEL, Egan DM, Collins PC *et al.* A qPCR MGB probe based eDNA assay for European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2017, **27**(6): 1341-1344. DOI: 10.1002/aqc.2788.
- [10] Currier CA, Morris TJ, Wilson CC *et al.* Validation of environmental dna (edna) as a detection tool for At-risk freshwater pearly mussel species (bivalvia: Unionidae). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2018, **28**(3): 545-558. DOI: 10.1002/aqc.2869.
- [11] Peñarrubia L, Alcaraz C, Vaate ABD *et al.* Validated methodology for quantifying infestation levels of dreissenid mussels in environmental DNA (eDNA) samples. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 39067. DOI: 10.1038/srep39067.
- [12] Shogren AJ, Tank JL, Egan SP *et al.* Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density,

- transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 2019, **64**(8): 1467-1479. DOI: 10.1111/fwb.13319.
- [13] Zhao M, Zhao MD, Ma CY *et al.* Studies on the application of the environmental DNA in aquatic eco-system. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, **25**(4): 714-720. DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17342. [赵明, 赵梦迪, 马春艳等. 环境 DNA 在水域生态中的研究进展. 中国水产科学, 2018, **25**(4): 714-720.]
- [14] Wu XP. Studies on freshwater mollusca in mid-lower reaches of Changjiang River[Dissertation]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 1998: 1-197. [吴小平. 长江中下游淡水贝类的研究[学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1998: 1-197.]
- [15] Mills LS, Pilgrim KL, Schwartz MK *et al.* Identifying *Lynx* and other North American felids based on MtDNA analysis. *Conservation Genetics*, 2000, **1**(3): 285-288. DOI: 10.1023/A: 1011574209558.
- [16] Wu RW, Liu YT, Wang S *et al.* Testing the utility of DNA barcodes and a preliminary phylogenetic framework for Chinese freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) from the middle and lower Yangtze River. *PLoS One*, 2018, **13**(8): e0200956. DOI: 10.1371/journal.pone.0200956.
- [17] Zhou CH, Ouyang S, Wu XP *et al.* Phylogeny of the genus *Lamprotula* (Unionidae) in China based on mitochondrial DNA sequences of 16S rRNA and ND1 genes. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, **53**(6): 1024-1030. [周春花, 欧阳珊, 吴小平等. 基于 16S rRNA 和 ND1 基因序列的中国蚌科丽蚌属的系统发育. 动物学报, 2007, **53**(6): 1024-1030.]
- [18] Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T *et al.* Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 2012, **13**(2): 193-197. DOI: 10.1007/s10201-011-0362-4.
- [19] Chen L, Wu L, Liu Y *et al.* Application of environmental DNA metabarcoding in ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, **36**(15): 4573-4582. DOI: 10.5846/stxb201501150125. [陈炼, 吴琳, 刘燕等. 环境 DNA metabarcoding 及其在生态学研究中的应用. 生态学报, 2016, **36**(15): 4573-4582.]
- [20] Miya M, Sato Y, Fukunaga T *et al.* MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2015, **2**(7): 150088. DOI: 10.1098/rsos.150088.
- [21] Zhang AJ, Hao YB, Guo AH *et al.* Universal primer screening and verification for fish environmental DNA research based on high-throughput sequencing technology. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, **31**(10): 1615-1623. [张爱菊, 郝雅宾, 郭爱环等. 基于高通量测序技术的鱼类环境 DNA 研究中通用引物的筛选验证. 浙江农业学报, 2019, **31**(10): 1615-1623.]
- [22] Piñol J, Mir G, Gomez-Polo P *et al.* Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, 2015, **15**(4): 819-830. DOI: 10.1111/1755-0998.12355.
- [23] Sun JY, Yang JH, Zhang XW. Identification and biomass monitoring of zooplankton Cladocera species with eDNA metabarcoding technology. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, **13**(5): 76-86. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180108001. [孙晶莹, 杨兴华, 张效伟. 环境 DNA(eDNA)宏条形码技术对枝角类浮游动物物种鉴定及其生物量监测研究. 生态毒理学报, 2018, **13**(5): 76-86.]
- [24] Deiner K, Renshaw MA, Li YY *et al.* Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, **8**(12): 1888-1898. DOI: 10.1111/2041-210X.12836.
- [25] Zhang GK, Chain FJJ, Abbott CL *et al.* Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications*, 2018, **11**(10): 1901-1914. DOI: 10.1111/eva.12694.
- [26] Morey KC, Bartley TJ, Hanner RH. Validating environmental DNA metabarcoding for marine fishes in diverse ecosystems using a public aquarium. *Environmental DNA*, 2020, **2**(3): 330-342. DOI: 10.1002/edn3.76.
- [27] Mächler E, Osathanunkul M, Altermatt F. Shedding light on eDNA: Neither natural levels of UV radiation nor the presence of a filter feeder affect eDNA-based detection of aquatic organisms. *PLoS One*, 2018, **13**(4): e0195529. DOI: 10.1371/journal.pone.0195529.
- [28] Xiong LF, Ouyang S, Chen TH *et al.* The resource status and spatio-temporal variation of freshwater mussel in Qinglan lake of Jiangxi Province. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2010, **32**(6): 1257-1264. DOI: 10.13836/j. jjau.2010219. [熊六凤, 欧阳珊, 陈堂华等. 江西青岚湖淡水蚌类的资源现状和时空变化. 江西农业大学学报, 2010, **32**(6): 1257-1264.]
- [29] Ushio M, Murakami H, Masuda R *et al.* Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-

- throughput sequencing. *BioRxiv*, 2017, DOI: 10.1101/113472. DOI: 10.1101/113472.
- [30] Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(11): 2565-2573. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.
- [31] Cowart DA, Murphy KR, Cheng CHC. Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula. *Marine Genomics*, 2018, **37**: 148-160. DOI: 10.1016/j.margen.2017.11.003.
- [32] Elbrecht V, Leese F. Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? testing primer bias and biomass—sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PLoS One*, 2015, **10**(7): e0130324. DOI: 10.1371/journal.pone.0130324.
- [33] Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK *et al.* Robust detection of rare species using environmental DNA: The importance of primer specificity. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e59520. DOI: 10.1371/journal.pone.0059520.
- [34] Li HX, Hung XN, Li SG *et al.* Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems. *Biodiversity Science*, 2019, **27**(5): 491-504. DOI: 10.17520/biods.2018233. [李晗溪, 黄雪娜, 李世国等. 基于环境 DNA-宏条形码技术的水生生态系统入侵生物的早期监测与预警. 生物多样性, 2019, **27**(5): 491-504.]